

## TWO-HYBRID METHOD IN MAMMALIAN CELL

Publication number: WO0071743

Publication date: 2000-11-30

Inventor: TSUKAHARA KAPPEI (JP); HIDA TAKAYUKI (JP);  
NAKAMURA KATSUJI (JP); YOSHITOMI HIDEKI (JP)

Applicant: EISAI CO LTD (JP); TSUKAHARA KAPPEI (JP); HIDA  
TAKAYUKI (JP); NAKAMURA KATSUJI (JP);  
YOSHITOMI HIDEKI (JP)

Classification:

- International: C12N15/10; G01N33/50; G01N33/542; C12N15/10;  
G01N33/50; G01N33/536; (IPC1-7): C12Q1/02;  
C07K19/00; C12N5/10; C12N15/62; C12Q1/42;  
C12Q1/68; G01N33/566

- European: C12N15/10C6; G01N33/50D2; G01N33/542

Application number: WO2000JP03353 20000525

Priority number(s): JP19990144946 19990525

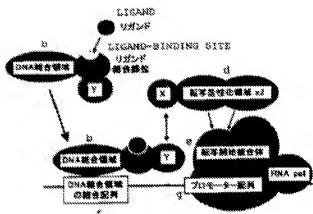
Cited documents:

WO9910510  
XP002930191  
XP002930192  
XP002930193  
XP002930194

Report a data error here

### Abstract of WO0071743

A method for detecting an interaction between a first protein and a second protein in a mammalian cell, which comprises, in a mammalian cell having a DNA carrying a reporter gene ligated thereto in the downstream of a base sequence binding to a DNA-binding region, expressing a fused protein of the first protein with two or more transcriptional activation regions which are the same or different, and another fused protein of the second protein with the above-described DNA-binding region, and then detecting the expression of the reporter gene.



b...DNA-BINDING REGION

d...TWO TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION REGIONS

e...TRANSCRIPTIONAL INITIATION COMPLEX

f...BINDING SEQUENCE OF DNA-BINDING REGION

g...PROMOTER SEQUENCE

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2000年11月30日 (30.11.2000)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 00/71743 A1

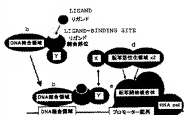
- (51) 国際特許分類: C12Q 1/02, 1/42, 1/68, C07K 19/00, C12N 15/62, 5/10, G01N 33/566
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/03353
- (22) 国際出願日: 2000年5月25日 (25.05.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平11/144946 1999年5月25日 (25.05.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザイ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒112-8088 東京都文京区小石川4丁目6番10号 Tokyo (JP).

- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 塚原克平 (TSUKAHARA, Kappei) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮4-4-24 Ibaraki (JP), 斎藤隆之 (HIDA, Takayuki) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮1丁目12-10 Ibaraki (JP), 中村勝次 (NAKAMURA, Katsuji) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県つくば市松代1-14-10 クレスト松代A-202 Ibaraki (JP), 佳富英樹 (YOSHITOMI, Hideki) [JP/JP]; 〒300-3261 茨城県つくば市花畑2-11-2 ソリオ花畑202号 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 遠山 勉, 外 (TOYAMA, Tsutomu et al.); 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): JP, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

/続葉有/

(54) Title: TWO-HYBRID METHOD IN MAMMALIAN CELL

(54) 発明の名称: 哺乳類細胞におけるツーハイブリッド法



b...DNA-BINDING REGION  
c...TWO TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION REGIONS  
e...TRANSCRIPTIONAL INITIATION COMPLEX  
f...BINDING SEQUENCE OF DNA-BINDING REGION  
g...PROMOTER SEQUENCE

(57) Abstract: A method for detecting an interaction between a first protein and a second protein in a mammalian cell, which comprises, in a mammalian cell having a DNA carrying a reporter gene ligated thereto in the downstream of a base sequence binding to a DNA-binding region, expressing a fused protein of the first protein with two or more transcriptional activation regions which are the same or different, and another fused protein of the second protein with the above-described DNA-binding region, and then detecting the expression of the reporter gene.

(57) 要約:

哺乳類細胞内における第1の蛋白質と第2の蛋白質の相互作用を検出する方法であって、

DNA結合領域と結合する塩基配列の下流にレポーター遺伝子を結合したDNAを有する哺乳類細胞内に、同一の又は異なる2個以上の転写活性化領域と第1の蛋白質との融合蛋白質、及び、該DNA結合領域と第2の蛋白質との融合蛋白質を発現させ、レポーター遺伝子の発現を検出することを含む方法。



添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## 哺乳類細胞におけるツーハイブリッド法

## 技術分野

本発明は、哺乳類細胞内における第1の蛋白質と第2の蛋白質の相互作用を、転写活性化領域と融合させた第1の蛋白質、及び、DNA結合領域と融合させた第2の蛋白質を用いたツーハイブリッド法により、効率よく検出する方法に関する。

## 従来技術

ツーハイブリッド法 (two-hybrid method) は、2種の蛋白質間の相互作用を、それぞれの融合蛋白質 (two hybrids) を用いて検出する方法である。ツーハイブリッド法においては、DNA結合領域と結合する塩基配列及びプロモーター配列並びにその下流にレポーター遺伝子をつないだDNAを有する細胞内で、第1の蛋白質と転写活性化領域(domain)との融合蛋白質、及び、第2の蛋白質と該DNA結合領域との融合蛋白質を発現させる。ここで第1の蛋白質と第2の蛋白質が互いに相互作用する性質を持っていると、DNA結合領域と該DNA結合領域と結合する塩基配列との結合、及び、第2の蛋白質と第1の蛋白質との相互作用により、プロモーター領域の近傍に転写活性化領域が引き寄せられる。その結果、下流に結合したレポーター遺伝子の転写効率が増大して、レポーター遺伝子産物の発現が増大する(図1)。つまりツーハイブリッド法は、細胞内で起こる第1の蛋白質(X)と第2の蛋白質(Y)の相互作用を、レポーター遺伝子の転写効率の上昇、例えばレポーター遺伝子産物の活性の増大として捉える方法である(Warbrick, E (1997) Structure 15:13-17)。

従来、ツーハイブリッド法は、通常には酵母を宿主細胞として行われ、これまでに互いに相互作用する蛋白質の高感度な検出法として多大な成果をもたらして来た(Fields, S. and Song, O. K. (1989) Nature 340:245-246, Dalton, S. and Trisman, R. (1992) Cell 68:597-612, Bartel, P. L. et al. (1993) In Cellular Interactions in Development: A Practical Approach)。しかし、酵母細胞内と哺乳類細胞内の環境が同一である保証はなく、哺乳類細胞内における蛋

白質間の相互作用を検出するためには、哺乳類細胞を宿主としたツーハイブリッド法を用いることが適切である。

また酵母を宿主細胞としたツーハイブリッド法を利用して、蛋白質間の相互作用を抑制する薬剤をスクリーニングする試みが為されたが、酵母細胞壁の薬剤透過性が低く、従って薬剤をスクリーニングする目的では、薬剤透過の障壁となる細胞壁を持たない哺乳類細胞を宿主としたツーハイブリッド法が適していると考えられた。

現在までに、哺乳類細胞を宿主としたツーハイブリッド法により、

1. 蛋白質間の比較的強い相互作用 (Fearon, E. R., et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7958-7962; Rickles, J. R., et al. (1998) Chem. Biol. 5:529-538)、
  2. 転写因子間の相互作用 (Fagan, R., et al. (1994) Cell 78:799-811; Fagan, R., et al. (1994) Cell 78:799-811; Dang, C. V., et al. (1991) Mol. Cell Biol. 11:954-962; Kim, H. J., et al. (1998) J. Biol. Chem. 273:28564-28567; Leahy, P., et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:8813-8822)、
- が検出できることが明らかにされている。しかし相互作用が弱い、感度が低い等の理由で相互作用がうまく検出できない場合を経験することが多く、哺乳類細胞を宿主とした場合には、従来のツーハイブリッド法は汎用性のある方法とはなっていない。

#### 発明の開示

本発明の課題は、従来の方法では検出できない程度に弱い蛋白質間の相互作用も検出可能で、より多くの種類の蛋白質間相互作用に適用可能なツーハイブリッド法を確立すること、更に該ツーハイブリッド法を用いた薬剤のスクリーニング法を開発することにある。

以下においては、転写活性化領域と融合させる第1の蛋白質を蛋白質X、DNA結合領域と融合させる第2の蛋白質を蛋白質Yとして説明する。

本発明者は、ツーハイブリッド法で蛋白質Xと蛋白質Yの相互作用を検出する感度を上昇させるためには、蛋白質Xと蛋白質Yの相互作用によりプロモーター

配列の近傍に引き寄せられた転写活性化領域が転写開始複合体と強く結合すれば、効率良く転写開始複合体を形成させられるのではないかと考えた。

そして、蛋白質Xに複数の転写活性化領域を融合させれば、転写活性化領域と転写開始因子の結合が強まり、転写開始複合体形成の効率が高まるのではないかと考えて、蛋白質Xに2個の転写活性化領域を融合させたところ、1個の転写活性化領域を融合させただけでは検出できなかった蛋白質間の相互作用を、検出できることを見出した。この知見に基づき本発明は完成された。

すなわち、本発明は、哺乳類細胞内における蛋白質Xと蛋白質Yの相互作用を検出する方法であって、

DNA結合領域と結合する塩基配列の下流にレポーター遺伝子を結合したDNAを有する哺乳類細胞内で、同一の又は異なる2個以上の転写活性化領域と蛋白質Xとの融合蛋白質、及び、該DNA結合領域と蛋白質Yとの融合蛋白質を発現させ、レポーター遺伝子の発現を検出することを含む方法（以下、「本発明検出法」ともいう）を提供する。

本発明検出法の特徴は、蛋白質Xに2個以上の転写活性化領域を融合させたことにある。

ここで蛋白質Xと蛋白質Yは、目的に応じて自由に選択することができる。例えば、細胞増殖のシグナル伝達に関与するsrc遺伝子中のSH3領域（src-SH3）とプロリン・リッチ・モチーフ(proline-rich motif)を含むペプチド (Rickles R. J., et. al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:10909-10913) 等、適宜選択でき、細胞内シグナル伝達機構の解明・薬物のスクリーニング等に用いることができるが、蛋白質Xと蛋白質Yはこの例に限定されるものではない。

転写活性化領域とは、転写因子蛋白質の転写活性促進能を持つ領域をいう。例えば単純ヘルペスウイルスの転写活性化因子VP-16の転写活性化領域（以下VP16ADと略す）、癌抑制遺伝子p53の転写活性化領域（以下p53ADと略す）等が挙げられるが、本発明はこれに限られるものではない。転写活性化領域の個数は2個以上なら良く、同種および異種の組合せは何れも許される。好ましくは2個或いは3個の転写活性化領域の組合せが、更に好ましくは2個の組合せが用いられる。転写活性化領域の一つはVP-16ADまたはp53ADであることが好ましい。VP16ADとp5

3ADの組合せが更に好ましい。

また、DNA結合領域とはプロモーター配列の上流に存在するDNA上の特定の塩基配列を認識し結合しうる転写因子蛋白質の領域をいう。例えば、酵母のガラクトース代謝に関与するGAL4のDNA結合領域（以下GAL4DBDと略す）、哺乳類細胞の増殖因子応答に関与するSRF DNA結合領域、細菌のDNA損傷応答に関与するLexA DNA結合領域等が挙げられるが、本発明はこれに限られるものではない。

レポーター遺伝子とは、それ自身の発現が促進されたということが何らかの方法で測定可能な遺伝子のことを言う。例えばHIS3遺伝子（ヒスチジン合成酵素欠損細胞中での発現誘導により、ヒスチジンを含まない培地中での増殖が可能になる）、CAT遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子が挙げられるが、本発明はこれに限られるものではない。好ましくは、哺乳類細胞で発現しX-galを基質とすると細胞が青色に染色されて検出可能な $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、哺乳類細胞で発現し細胞外に分泌されて培養上清から検出可能な分泌型アルカリフォスファターゼが望ましい。

DNA結合領域と結合する塩基配列の下流にレポーター遺伝子を結合したDNAを有する哺乳類細胞内で、同一の又は異なる2個以上の転写活性化領域と蛋白質Xとの融合蛋白質、及び、該DNA結合領域と蛋白質Yとの融合蛋白質を発現させる方法としては、哺乳類細胞内に、（1）同一の又は異なる2個以上の転写活性化領域と蛋白質Xとの融合蛋白質を発現させ、（2）DNA結合領域と蛋白質Yとの融合蛋白質を発現させ、（3）該DNA結合領域と結合する塩基配列の下流に、レポーター遺伝子を結合したDNAを導入する方法が挙げられる。

レポーター遺伝子の発現の検出は、通常、蛋白質Xと蛋白質Yの相互作用によるレポーター遺伝子の発現の促進を検出することにより行われる。

また蛋白質Xと蛋白質Yの相互作用を阻害する薬剤のスクリーニングに当たっては、転写開始複合体が形成されてしまった後に薬剤を加えて、蛋白質Xと蛋白質Yの相互作用を阻害し、転写活性化領域の関与を無くして転写開始複合体を崩壊させるよりも、転写開始複合体が形成される以前から薬剤を加えて、蛋白質Xと蛋白質Yの相互作用を阻害し、転写活性化領域の関与を無くして、転写開始複合体の形成を阻害する方が容易であることが報告されている（Chaudhuri B., et.

al. (1995) FEBS letters 357:221-226)。

そこで本発明検出法を、蛋白質Xと蛋白質Yの相互作用を阻害する薬剤のスクリーニングに用いる場合は、好ましくはリガンドを添加することによって転写活性化が起こるように、2個以上の転写活性化領域と蛋白質Xとの融合蛋白質、又はDNA結合領域と蛋白質Yとの融合蛋白質が、リガンドとの結合により立体構造が変化して転写活性化活性もしくはDNA結合活性が変化するように、好ましくはリガンドとの結合により立体構造が変化して初めて、転写活性化活性もしくはDNA結合活性を持つように、リガンド結合部位を融合させた融合蛋白質であることが好ましい。更に好ましくは、リガンド結合部位を融合させた融合蛋白質はDNA結合領域との融合蛋白質である。

ここでリガンドとは、対応するリガンド受容体と結合して受容体の構造変化を引き起こす低分子化合物を指す。またリガンド結合部位とは、リガンド受容体中のリガンドと結合する部位である。例えばリガンドとしてエストロゲンが、リガンド結合部位としてはエストロゲン受容体のエストロゲン結合部位が挙げられるが本発明はこれに限られるものではない。例えば、DNA結合部位をエストロゲン受容体のエストロゲン結合部位と融合することにより、エストロゲン結合部位がエストロゲンと結合して初めて、融合蛋白質のDNA結合活性が促進され、もしくは核内移行が促進されて、DNA結合部位はDNAと結合できるようになる(図2)。

この様な構成とすることにより、リガンドの添加以前には、転写開始複合体が形成されていないことなどにより転写活性化が起こらず、薬剤の存在下でリガンドを添加すると、薬剤により蛋白質Xと蛋白質Yの相互作用が阻害されない場合には、転写活性化が起こり、レポーター遺伝子が転写された結果を得ることができる一方、薬剤により蛋白質Xと蛋白質Yの相互作用が阻害された場合には、転写活性化領域の関与が無くなり、転写活性化が阻害されて、レポーター遺伝子の転写が抑制された結果を得ることができる。

また本発明は、本発明検出法を用いた、薬剤のスクリーニング方法、すなわち、互いに相互作用する性質を有する第1の蛋白質と第2の蛋白質を用い、第1の蛋白質と第2の蛋白質の相互作用に影響を与える薬剤をスクリーニングする方法であって、



DNA結合領域と結合する塩基配列の下流にレポーター遺伝子を結合したDNAを有する哺乳類細胞で、同一の又は異なる2個以上の転写活性化領域と第1の蛋白質との融合蛋白質、及び、該DNA結合領域と第2の蛋白質との融合蛋白質を発現させ、該哺乳類細胞を薬剤の存在下で培養し、レポーター遺伝子の発現の変化を指標として薬剤をスクリーニングすることを含む方法（以下、「本発明スクリーニング法」ともいう）を提供する。

蛋白質Xと蛋白質Yの例としては、src-SH3とプロリン・リッチ・モチーフを含むペプチドの組合せ、ショウジョウバエ癌抑制遺伝子DlgのヒトホモログhDlg中のPDZ配列を有するペプチド（以下hDlg-PDZと略す）とシェーカー型KチャンネルKv1.4のC末端アミノ配列を含むペプチドの組合せ等が挙げられるが本発明はこれに限られるものではない。

加えて本発明は、本発明スクリーニング法により見出された化合物を提供する。

更に本発明は、本発明検出法で用いる同一の又は異なる2個以上の転写活性化領域と蛋白質Xとの融合蛋白質、その融合蛋白質をコードするDNA、そのDNAを含むベクター、そのベクターにより形質転換した細胞も提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、ツーハイブリッド法の説明のための模式図である。

図2は、転写活性化領域を2個にし、DNA結合領域にリガンド結合部位を融合させたツーハイブリッド法の説明のための模式図である。

図3は、2個以上の転写活性化領域によるsrc-SH3とプロリン・リッチ・モチーフを含むペプチドの相互作用の検出の結果を示す。GAL4DBD: GAL4 DNA結合領域、SH3: src-SH3、VP16AD: VP16転写活性化領域、Pro5: プロリン・リッチ・モチーフ、p53AD: p53転写活性化領域、Pro6: 変異プロリン・リッチ・モチーフ。

図4は、エストロゲンレセプターのリガンド結合領域を用いた転写活性の誘導の結果を示す。GAL4DBD: GAL4 DNA結合領域、SH3: src-SH3、VP16AD: VP16転写活性化領域、Pro5: プロリン・リッチ・モチーフ、p53AD: p53転写活性化領域、ERLBD: エストロゲンレセプターのリガンド結合部位。

図5は、2個以上の転写活性化領域によるhDlg-PDZとKv1.4 C末端アミノ酸配

6/1

列の相互作用の検出の結果を示す。GAL4DBD: GAL4 DNA結合領域、PDZ1: hDlg-PDZ1、VP16AD: VP16転写活性化領域、PDZ2: hDlg-PDZ2、p53AD: p53転写活性化領域、Kv1.4: シェーカー型Kチャンネル。

図6は、3個の転写活性化領域によるsrc-SH3とプロリン・リッチ・モチーフを含むペプチドの相互作用の検出の結果を示す。GAL4DBD: GAL4 DNA結合領域、SH3: src-SH3、VP16AD: VP16転写活性化領域、Pro15: 変異プロリン・リッチ・モチーフ、p53AD: p53転写活性化領域。

発明を実施するための最良の形態

本発明検出法は、転写活性化領域と蛋白質Xとの融合蛋白質として、2個以上

の転写活性化領域と蛋白質Xとの融合蛋白質を用いることの他は、従来のツーハイブリッド法と同様でよい。

本発明スクリーニング法は、ツーハイブリッド法として、本発明検出法を用いる他は、従来のツーハイブリッド法を用いた、薬剤のスクリーニング方法と同様でよい。

本発明検出法で用いる2個以上の転写活性化領域と蛋白質Xとの融合蛋白質、その融合蛋白質をコードするDNA、そのDNAを含むベクター、そのベクターにより形質転換した細胞も、2個以上の転写活性化領域を蛋白質Xに融合させることの他は、従来と同様にして得ることができる。

2個以上の転写活性化領域と蛋白質Xとの融合蛋白質において、蛋白質Xと転写活性領域との間および転写活性領域間には、DNA結合領域と蛋白質Yとの融合蛋白質と複合体を形成したときの転写活性化の作用を妨げない限り、リンカーとして機能するペプチドが含まれていてもよい。リガンド結合部位を用いたときの、リガンド結合部位と、蛋白質Xもしくは蛋白質Y又は転写活性化領域もしくはDNA結合領域との間も、リガンドとの結合による転写活性化活性の変化を妨げない限り同様である。

リガンド結合部位は、蛋白質X又は蛋白質Yと転写活性化領域又はDNA結合領域との間に存在することが好ましいが、リガンドとの結合による転写活性化活性の変化がある限り、他の位置にあってもよい。

以下、融合蛋白質を発現させるため、および、哺乳類細胞にレポーター遺伝子を含むDNAを保持させるために用いるベクターの構築の例、並びに、ツーハイブリッド法の工程の例について説明する。

## 1. ベクターの構築

一つの例として、転写活性化領域としてVP16AD及びp53AD、DNA結合領域としてGAL4DBD、蛋白質X及び蛋白質Yとしてsrc-SH3及びプロリン・リッチ・モチーフを含むペプチドの組合せ、リガンド結合部位としてエストロゲン受容体のエストロゲン結合部位を使用した場合について説明する。また以下の説明においては、プロリン・リッチ・モチーフを含むペプチドとして、Rickleら報告した配列の後ろに更にArg-Tyrを付け足したペプチド（以下Pro5と称す）を用いる。

尚、以下に記載する操作は適当なマニュアル、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY等に記載の方法に従って行うことができる。

1). 転写活性化領域融合蛋白質をコードするDNA: 転写活性化領域をコードするDNA、例えばVP16ADをコードするDNAの直後に、もう一つの転写活性化領域をコードするDNA、例えばp53ADをコードするDNAを、コドンの読み枠が同じになるように連結する。適当な制限酵素サイトがある場合は制限酵素サイトを利用して連結し、無い場合はPCRプライマーに制限酵素サイトを付加しPCRにより制限酵素サイトを組み込んで連結する。

場合によっては、更に多数の転写活性化領域をコードするDNAを連結しても良い。

同様に、連結した転写活性化領域をコードするDNAの直後に、相互作用を検出したい蛋白質XをコードするDNA、例えばPro5をコードするDNAおよびsrc-SH3をコードするDNAの一方を連結する。

2). DNA結合領域融合蛋白質をコードするDNA: DNA結合領域をコードするDNA、例えばGAL4DBDをコードするDNAの直後に相互作用を検出したい蛋白質YをコードするDNA、例えばPro5をコードするDNAおよびsrc-SH3をコードするDNAの他方をコドンの読み枠が同じになるように連結する。適当な制限酵素サイトがある場合は制限酵素サイトを利用して連結し、無い場合はPCRプライマーに制限酵素サイトを付加しPCRにより制限酵素サイトを組み込んで連結する。

3). 1)又は2)の融合蛋白質に、更にリガンド結合部位を融合した融合蛋白質をコードするDNA: 2)のDNA結合領域融合蛋白質にリガンド結合部位を融合した融合蛋白質について述べるが本発明はこれに限られるものではない。

DNA結合領域をコードするDNA、例えばGAL4DBDをコードするDNAの直後にリガンド結合部位、例えばエストロゲン受容体のエストロゲン結合部位(ER-LBD)をコードするDNAを、コドンの読み枠が同じになるように連結する。適当な制限酵素サイトがある場合は制限酵素サイトを利用して連結し、無い場合はPCRプライマーに制限酵素サイトを付加しPCRにより制限酵素サイトを組み込んで連結する。

同様に、連結したDNA結合領域をコードするDNAの直後に、相互作用を検出

したい蛋白質YをコードするDNAを連結する。

4). レポーターDNA：レポーター遺伝子、例えば分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子 (Goto, M. et. al., Mol. Pharmacol. 49:860-873, 1996) をコードするPLAP遺伝子の上流に、プロモーター配列、例えば単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子の最小プロモーター配列を連結する。

更に上流に該DNA結合領域の結合塩基配列、例えばDNA結合領域がGAL4DBDの場合には上流活性化配列(Upstream activating sequence; UAS)を連結する。

上記1)～4)のDNAを、哺乳類細胞での発現に適したベクター (プラスミド) に組み込み、ベクターを構築する。

## 2. ツーハイブリッド法

1). DNAトランスフェクション： $1 \times 10^4$ 個～ $2 \times 10^5$ 個の哺乳類細胞、例えばCOS-1、HEK293等を24-ウェルプレート上で培養する。翌日にDNA結合領域融合蛋白質をコードするDNAを含むベクターと、転写活性化領域融合蛋白質をコードするDNAを含むベクター、およびレポーターDNAを含むベクターをそれぞれ適当量、好ましくは400 ngを、トランスフェクションする。トランスフェクション法は、DEAEデキストラン法、リン酸カルシウム法、リポフェクチン法等、効率よくDNAを導入できれば如何なる方法も許されるが、好ましくはリポフェクチン法、更に好ましくはFuGENE™6 Transfection reagent (ベーリンガー・マンハイム社製)を用いる方法が挙げられる。レポーターDNAを有している哺乳類細胞に、DNA結合領域融合蛋白質をコードするDNAを含むベクターと、転写活性化領域融合蛋白質をコードするDNAを含むベクターとをトランスフェクションしてもよい。

2). レポーターアッセイ：レポーターアッセイは、それぞれのレポーター遺伝子に適した方法により行われる。以下にレポーター遺伝子が分泌型アルカリフォスファターゼ(PLAP)遺伝子である場合について述べるが、本発明はこれに限られるものではない。

DNAをトランスフェクションした後、適当な時間、好ましくは6時間から24時間培養し、培養上清を回収する。培養上清を65℃で10～20分間熱処理して血清に含まれるアルカリフォスファターゼを失活させた後、緩衝液 (0.28 M 炭酸緩衝液、

8 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 10) 及びルミスチン (住友化学社製) を加え、室温又は37°Cで30~60分保温し、この反応液中の化学発光を測定することによりアルカリフォスファターゼ活性を算出する。

3). リガンドによる誘導: リガンドによる誘導は、それぞれのリガンド結合部位に適した方法により行われる。以下にリガンド結合部位がエストロゲン受容体のエストロゲン結合部位である場合について述べるが、本発明はこれに限られるものではない。

DNAトランスフェクションの24時間後に培養上清を取り除き、新たに10 nMの $\beta$ -エストラジオールを含んだ培養液を加え、更に24時間培養する。その後、2)のレポーターアッセイを行う。

## 実施例

実施例 1 2 個以上の転写活性化領域によるsrc-SH3とPro5の相互作用の検出

2.5×10<sup>4</sup>個のサルCOS-1細胞を24-ウェルプレート上で1日培養した後、DNA結合領域をコードするDNAを含むプラスミド、転写活性化領域をコードするDNAを含むプラスミド、DNA結合領域と結合する塩基配列を含むプロモーター領域 (塩基配列を配列番号 1 1 に示す) 及びその下流にレポーター遺伝子 (分泌型アルカリフォスファターゼ (PLAP) 遺伝子) を含むプラスミドの3種類を、図3に示す組合せでトランスフェクションした。22時間後に50  $\mu$ lの培養上清を回収し、この中に含まれる分泌型アルカリフォスファターゼ量を測定した。

COS-1細胞に導入したプラスミドは以下の様に構築した。

1). GAL4DBD-SH3: GAL4DBDをコードするDNAは、Mammalian MATCHMAKER two-hybrid assay kit (CLONTECH社製) に含まれるベクターpMから切り出した。SH3をコードするDNAは、human 5'-STRETCH PLUS cDNA library (lung) (CLONTECH社製) を鋳型とし、AAAGAATTCTGGCCGGTGGAGTGA (配列番号 2 2) 及び TTTGGATCCCGGAGGGCCAC (配列番号 2 3) の塩基配列を有するオリゴデオキシリボヌクレオチド (オリゴDNA) をプライマーとしてPCRにより増幅した。これらDNAをベクター中の制限酵素部位及びプライマー中に設計した制限酵素部位を利用して、pcDNA3.1 (INVITRO社製) に組み込んだ。

2), VP16AD-p53AD-Pro5: VP16ADをコードするDNAはMammalian MATCHMAKER two-hybrid assay kit (CLONTECH社製)に含まれるベクターpVP16から切り出した。p53ADをコードするDNAは、日本DNAデータバンクより入手したp53遺伝子クローンを鋳型とし、AAACAATTGACCATGGAGGAGC (配列番号 2 4) 及びAAAGAATTGCTTTCAGTGA ACCATTGTTCAA (配列番号 2 5) の塩基配列を有するオリゴDNAをプライマーとしてPCRにより増幅した。Pro5をコードするDNAは、両端に制限酵素部位を追加した、配列番号 2 6 に示すアミノ酸配列を含むアミノ酸配列をコードするオリゴDNA及びその相補配列を有するオリゴDNAを合成し、これらをアニールさせた(時に、Pro5配列まで含んだプライマーを合成し、p53ADとPro5をコードするDNAを一続きのDNAとして増幅した。)。これらDNAをベクター中の制限酵素部位並びにプライマー中及び合成オリゴDNA中に設計した制限酵素部位を利用して、pcDNA3.1 (INVITRO社製)に組み込んだ。

上記以外のプラスミドは上記に準じた方法により構築した。

トランスフェクションは、FuGene 6 Transfection Reagent (ペーリンガーマーンハイム社製)を使用し、上記試薬の取り扱い説明書に準じて行った。

アルカリフォスファターゼの活性は、培養上清15 $\mu$ lを回収し、65°Cで10分保温することにより内在性アルカリフォスファターゼを失活させた後、60 $\mu$ lの炭酸バッファー(0.28 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 10.0、8 mM MgSO<sub>4</sub>)および75 $\mu$ lのルミステイン(住友金属工業製)を加え、遮光下にて37°Cで30分保温した後、室温でさらに30分放置し、化学発光をマイクロプレートルミノメーターにて測定した。

図3に示すように、DNA結合領域をコードするDNAを含むプラスミドとして、GAL4DBDとsrc-SH3の融合蛋白質をコードするDNA(塩基配列およびコードされるアミノ酸配列を配列番号1及び2に示す)を含むものを使用し、転写活性化領域をコードするDNAを含むプラスミドとして、1個の転写活性化領域VP16ADとPro5の融合蛋白質をコードするDNA(塩基配列およびコードされるアミノ酸配列を配列番号3及び4に示す)を含むものを使用した場合には、src-SH3とPro5の相互作用は検出できなかった(3)。一方、転写活性化領域をコードするDNAを含むプラスミドとして、2個の転写活性化領域(VP16AD-p53AD)とPro5の融合蛋白質をコードするDNA(塩基配列およびコードされるアミノ酸配列を配列番号5及び6

に示す)を含むものを使用した場合には強い転写活性化が見られた(4)。また、Pro5の代わりに、Pro5の3番目のLeuをAlaに、9番目のProをAlaに置換することでsrc-SH3との相互作用が著しく減弱していることが報告されているPro6を使用した場合、転写活性化が起こらなかった(5)。

陰性対照である、転写活性化領域VP16ADにPro5を融合させなかった場合(1, 2)、及びDNA結合領域GAL4DBDにsrc-SH3を融合させなかった場合(1, 6)、GAL4DBDを入れなかった場合(7)は、転写活性化は起こらなかった。

これらの結果より、転写活性化領域が1個の場合には検出できなかったsrc-SH3とPro5の相互作用が(3)、転写活性化領域を2個つなげることにより検出可能であることが明らかとなった(4)。更にPro5に変異を入れたPro6では転写活性化は起こらない(5)ことから、この転写活性化がsrc-SH3とPro5の相互作用を反映したものであることが示された。

実施例2 エストロゲンレセプターのリガンド結合領域を用いた転写活性の調節

$2 \times 10^5$ 個のHEK293細胞を24-ウェルプレート上で1日培養した後、DNA結合領域及びエストロゲンレセプターのリガンド結合領域(以下ERLBDと略す)をコードするDNA(塩基配列およびコードされるアミノ酸配列を配列番号7及び8に示す)を含むプラスミド、転写活性化領域をコードするDNA(塩基配列およびコードされるアミノ酸配列を配列番号9及び10に示す)を含むプラスミド、プロモーター領域及びその下流にレポーター遺伝子(PLAP遺伝子)を含むプラスミドの3種類を、図4に示す組合せでトランスフェクションした。5時間後に $\beta$ -エストラジオールを最終濃度10 nMになるように加え、28時間後に50  $\mu$ lの培養上清を回収し、この中に含まれる分泌型アルカリフォスファターゼ量を測定した。

HEK293細胞に導入したプラスミドは以下の様に構築した。

1). GAL4DBD-ERLBD-SH3: GAL4DBD及びSH3をコードするDNAは実施例1に準じて調製した。ERLBDをコードするDNAは、human 5'-STRETCH PLUS cDNA library (CLONTECH社製)を鋳型とし、AAACAATTGCTGCTGGAGACATGAGAGC(配列番号27)及びAAGAATTGCACTGTGGCAGGAAACC(配列番号28)の塩基配列を有するオリゴDNAをプライマーとしてPCRで増幅した。これらDNAをバクター中の制限酵素部位及びプ



ライマー中に設計した制限酵素部位を利用して、pcDNA3.1 (INVITRO社製) に組み込んだ。

上記以外のプラスミドは上記に準じた方法により構築した。

トランスフェクション及びアルカリフォスファターゼ活性測定は実施例 1 に準じて行った。

src-SH3をDNA結合領域に、Pro5を転写活性化領域にそれぞれ融合した場合、及び、Pro5をDNA結合領域に、src-SH3を転写活性化領域にそれぞれ融合した場合の何れでも、10 nM  $\beta$ -エストラジオール添加によりレポーター遺伝子の転写活性化が約3倍から4倍上昇した(図4)。

この結果から、ERLBDを融合することにより、 $\beta$ -エストラジオールによって転写活性化が制御できることが分かった。

この方法により、DNAをトランスフェクションしただけでは転写活性化が起こらず、 $\beta$ -エストラジオールを加えて初めて転写活性化が起こり、従って $\beta$ -エストラジオールと同時に被検薬剤を添加すれば、被検薬剤が転写活性化を阻害するか否か、即ち被検薬剤が融合蛋白質間の相互作用を抑制するか否かを検証することが可能となった。

実施例 3 2個以上の転写活性化領域によるhDlg-PDZとKv1.4 C末端アミノ酸配列を有するペプチドの相互作用の検出

2個以上の転写活性化領域を融合したツーハイブリッド法により、ショウジョウバエ癌抑制遺伝子DlgのヒトホモログhDlg中のPDZ配列を有するペプチドと、シェーカー型KチャンネルKv1.4の間の相互作用を検出することを試みた。

$2 \times 10^4$ 個のサルCOS-1細胞を24-ウェルプレート上で1日培養した後、DNA結合領域を含むプラスミド、転写活性化領域を含むプラスミド、プロモーター領域及びその下流にレポーター遺伝子PLAP (分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子) を含むプラスミドの3種類を、図5に示す組合せでトランスフェクションした。24時間後に50  $\mu$ lの培養上清を回収し、この中に含まれる分泌型アルカリフォスファターゼ量を測定した。

COS-1細胞に導入したプラスミドは以下の様に構築した。

1). GAL4DBD-PDZ2 : GAL4DBDをコードするDNAは実施例 1 に準じて調製した。PDZ2 をコードするDNAは、QUICK-Screen Human cDNA library Panel cat. K1003-1のlung (λgt11) (CLONTECH社製)を鋳型とし、AAAGAATTCAGAAGGAACCAAGTGTGAGAAA (配列番号 2 9) 及びAAAGGATCCTCAAGGTTCCCTTGTAATTCAT (配列番号 3 0) の塩基配列を有するオリゴDNAをプライマーとしてPCRで増幅した。これらDNAをベクター中の制限酵素部位及びプライマー中に設計した制限酵素部位を利用して、pcDNA3.1 (INVITRO社製)に組み込んだ。

2). GAL4DBD-PDZ1-PDZ2 : GAL4DBDをコードするDNAは実施例 1 に準じて調整した。PDZ1-PDZ2をコードするDNAは、QUICK-Screen Human cDNA library Panel cat. K 1003-1のlung (λgt11) (CLONTECH社製)を鋳型とし、AAAGAATTCCTGGTCAACACAG ATAGCTTG (配列番号 3 1) 及びAAAGGATCCTCAAGGTTCCCTTGTAATTCAT (配列番号 3 2) の塩基配列を有するオリゴDNAをプライマーとしてPCRで増幅した。これらDNAをベクター中の制限酵素部位並びにプライマー中及び合成オリゴDNA中に設計した制限酵素部位を利用して、pcDNA3.1 (INVITRO社製)に組み込んだ。

3). VP16AD-p53AD-Kv1.4 : VP16AD及びp53ADをコードするDNAは実施例 1 に準じて調製した。また、Kv1.4をコードするDNAは、オリゴDNA (塩基配列 : AAAGAATTCGATAAACAACTGTTCTAATGCAAGGCTGTGGAGACTGATGTGTGAGGATCCAAA (配列番号 3 3) ) 及びその相補配列を有するオリゴDNAを合成し、これらをアニールさせた。これらDNAをベクター中の制限酵素部位並びにプライマー中及び合成オリゴDNA中に設計した制限酵素部位を利用して、pcDNA3.1 (INVITRO社製)に組み込んだ。

上記以外のプラスミドは上記に準じた方法により構築した。

トランスフェクション及びアルカリフォスファターゼ活性測定は実施例 1 に準じて行った。

図 5 に示すように、DNA結合領域をコードするDNAを含むプラスミドとして、GAL4DBDとhD1gのN末端から数えて2番目のPDZの融合蛋白質をコードするDNA (塩基配列およびコードされるアミノ酸配列を配列番号 1 2 及び 1 3 に示す)、又はGAL4DBDとhD1gのN末端から数えて1番目と2番目のPDZを含む領域の融合蛋白質をコードするDNA (塩基配列およびコードされるアミノ酸配列を配列番号 1 4 及び 1 5 に示す)を含むものを使用し、転写活性化領域をコードするDNAを含むプラス

ミドとして、1個の転写活性化領域VP16ADとKv1.4のC末端の15アミノ酸の融合蛋白質をコードするDNA（塩基配列およびコードされるアミノ酸配列を配列番号16及び17に示す）を含むものを使用した場合には、弱い転写活性しか検出できなかった（2, 4）。一方、2個の転写活性化領域（VP16AD-p53AD）とKv1.4のC末端の15アミノ酸の融合蛋白質をコードするDNA（塩基配列およびコードされるアミノ酸配列を配列番号18及び19に示す）を含むものを使用した場合には強い転写活性化が見られた（3, 5）。

陰性対照である、転写活性化領域VP16AD及びDNA結合領域GAL4DBDのみの場合（1）は、転写活性化は起こらなかった。

これらの結果より、転写活性化領域を2個つなげることにより、hD1g-PDZとKv1.4のC末端アミノ酸配列の相互作用を、より確実に検出できることが明らかとなった。

#### 実施例4 2個以上の転写活性化領域によるsrc-SH3とPro15の相互作用の検出

Pro5の代わりに、Pro5の3番目のLeuをAlaに置換することによってsrc-SH3との相互作用が減弱したPro15を用いたことは実施例1と同様に相互作用を検出した。

GAL4DBD、VP16AD、p53AD、SH3及びPro15をコードするDNAを、実施例1に準じて調製し、これらDNAをベクター中の制限酵素部位並びにプライマー中及び合成オリゴDNA中に設計した制限酵素部位を利用して、pcDNA3.1（INVITRO社製）に組み込んだ。

トランスフェクション及びアルカリフォスファターゼ活性測定は実施例1に準じて行った。

図6に示すように、2個の転写活性化領域（VP16AD-p53AD）との融合蛋白質を使用した場合には、src-SH3との相互作用が弱いPro15であっても、その相互作用が検出された（2）。

さらに、転写活性化領域をコードするDNAを含むプラスミドとして、VP16ADにp53ADを2個接続した、転写活性化領域を3個含む融合蛋白質をコードするDNA（塩基配列およびコードされるアミノ酸配列を配列番号20及び21に示す）を

含むものを用いると(3)、転写活性化領域を2個含む融合蛋白質の場合(2)と比較して、更に転写活性が上昇し、src-SH3との相互作用が減弱したPro15の弱い相互作用を一層感度よく検出することが可能であった。

陰性対照である、DNA結合領域GAL4DBDにsrc-SH3を融合させなかった場合(1)は、転写活性化は起こらなかった。

これらの結果より、src-SH3とPro5の相互作用よりもさらに弱い相互作用であっても、転写活性化領域を2個つなげることにより検出可能であることが明らかとなった(2)。更に転写活性化領域をつなげることにより検出の感度が増すことが示された(3)。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、哺乳類細胞内において従来のツーマイブリッド法では検出できなかったような蛋白質間相互作用を、検出することが可能となる。

## 請求の範囲

1. 哺乳類細胞内における第1の蛋白質と第2の蛋白質の相互作用を検出する方法であって、

DNA結合領域と結合する塩基配列の下流にレポーター遺伝子を結合したDNAを有する哺乳類細胞内で、同一の又は異なる2個以上の転写活性化領域と第1の蛋白質との融合蛋白質、及び、該DNA結合領域と第2の蛋白質との融合蛋白質を発現させ、レポーター遺伝子の発現を検出することを含む方法。

2. 転写活性化領域の数が2個である請求項1に記載の方法。

3. 転写活性化領域の一つがVP-16転写活性化領域である請求項1に記載の方法。

4. 転写活性化領域の一つがp53転写活性化領域である請求項1に記載の方法。

5. 転写活性化領域がVP-16転写活性化領域及びp53転写活性化領域を含む請求項1に記載の方法。

6. 2個以上の転写活性化領域と第1の蛋白質との融合蛋白質、又はDNA結合領域と第2の蛋白質との融合蛋白質が、リガンドとの結合により立体構造が変化して転写活性化活性もしくはDNA結合活性が変化するように更にリガンド結合部位を融合させた融合蛋白質である請求項1に記載の方法。

7. リガンド結合部位が、エストロゲン受容体のエストロゲン結合部位である請求項6に記載の方法。

8. レポーター遺伝子が、分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子である請求項1に記載の方法。

9. レポーター遺伝子が、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子である請求項1に記載の方法。

10. 互いに相互作用する性質を有する第1の蛋白質と第2の蛋白質を用い、第1の蛋白質と第2の蛋白質の相互作用に影響を与える薬剤をスクリーニングする方法であって、

DNA結合領域と結合する塩基配列の下流にレポーター遺伝子を結合したDNAを有する哺乳類細胞で、同一の又は異なる2個以上の転写活性化領域と第1の蛋白質

との融合蛋白質、及び、該DNA結合領域と第2の蛋白質との融合蛋白質を発現させ、該哺乳類細胞を薬剤の存在下で培養し、レポーター遺伝子の発現の変化を指標として薬剤をスクリーニングすることを含む方法。

11. 互いに相互作用する第1の蛋白質と第2の蛋白質の何れかがsrc-SH3であり、他方がプロリン・リッチ・モチーフを含むペプチドである請求項10に記載の方法。

12. 互いに相互作用する第1の蛋白質と第2の蛋白質の何れかが、ショウジョウバエ癌抑制遺伝子DlgのヒトホモログhDlg中のPDZ配列を有するペプチドであり、他方がシェーカー型KチャンネルKv1.4のC末端アミノ配列を含むペプチドである請求項10に記載の方法。

13. 請求項10に記載の方法により得られた化合物。

14. 請求項1に記載の方法において使用するための、同一の又は異なる2個以上の転写活性化領域と第1の蛋白質とを融合させた蛋白質。

15. 請求項14に記載の蛋白質をコードするDNA。

16. 請求項15に記載のDNAを含むベクター。

17. 請求項16に記載のベクターにより形質転換した哺乳類細胞。

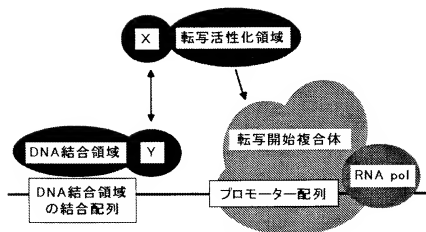


図 1

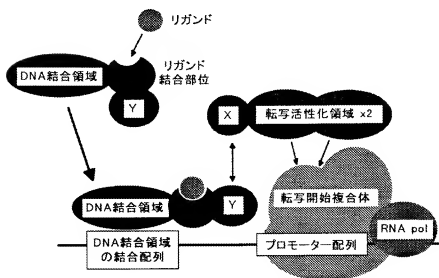


図 2

2/3

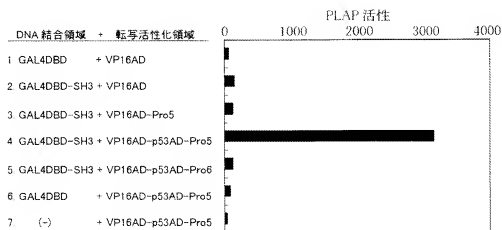


図 3

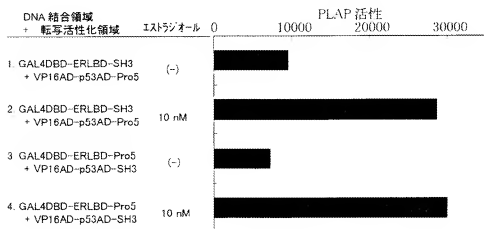


図 4



3/3

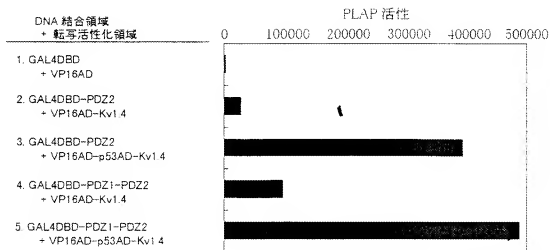


図 5

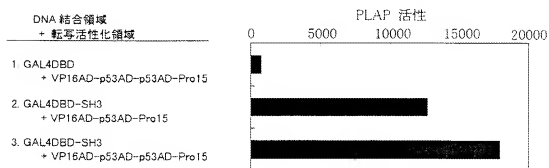


図 6

## 配列表 (Sequence Listing)

&lt;110&gt; エーザイ株式会社 (Eisai Co., Ltd.)

&lt;120&gt; 哺乳類細胞におけるツ－ハイブリッド法

&lt;130&gt; 0006W010P998

&lt;150&gt; JP 11-144946

&lt;151&gt; 1999-05-25

&lt;160&gt; 33

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 643

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hybrid gene

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(642)

&lt;400&gt; 1

atg aag cta ctg tct tct atc gaa caa gca tgc gat att tgc cga ctt	48
Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu	
1 5 10 15	
aaa aag ctc aag tgc tcc aaa gaa aaa ccg aag tgc gcc aag tgt ctg	96
Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu	
20 25 30	
aag aac aac tgg gag tgt cgc tac tct ccc aaa acc aaa agg tct ccg	144
Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro	
35 40 45	
ctg act agg gca cat ctg aca gaa gtg gaa tca agg cta gaa aga ctg	192
Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu	
50 55 60	

2/35

```

gaa cag cta ttt cta ctg att ttt cct cga gaa gac ctt gac atg att 240
Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile
  65              70              75              80
ttg aaa atg gat tct tta cag gat ata aaa gca ttg tta aca gga tta 288
Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu
      85              90              95
ttt gta caa gat aat gtg aat aaa gat gcc gtc aca gat aga ttg gct 336
Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala
      100             105             110
tca gtg gag act gat atg cct cta aca ttg aga cag cat aga ata agt 384
Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser
      115             120             125
gcg aca tca tca tcg gaa gag agt agt aac aaa ggt caa aga cag ttg 432
Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu
      130             135             140
act gta tcg ccg gaa ttc ctg gcc ggt gga gtg acc acc ttg gtg gcc 480
Thr Val Ser Pro Glu Phe Leu Ala Gly Gly Val Thr Thr Phe Val Ala
      145             150             155             160
ctc tat gac tat gag tct agg acg gag aca gac ctg tcc ttc aag aaa 528
Leu Tyr Asp Tyr Glu Ser Arg Thr Glu Thr Asp Leu Ser Phe Lys Lys
      165             170             175
ggc gag cgg ctc cag att gtc aac aac aca gag gga gac tgg tgg ctg 576
Gly Glu Arg Leu Gln Ile Val Asn Asn Thr Glu Gly Asp Trp Trp Leu
      180             185             190
gcc cac tcg ctc agc aca gga cag aca ggc tac atc ccc agc aac tac 624
Ala His Ser Leu Ser Thr Gly Gln Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr
      195             200             205
gtg gcg ccc tcc ggg atc c
Val Ala Pro Ser Gly Ile
      210

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 214

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hybrid protein

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DNA\_BIND

&lt;222&gt; (1)..(147)

&lt;223&gt; GAL4DBD

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMAIN

&lt;222&gt; (151)..(214)

&lt;223&gt; src-SH3

&lt;400&gt; 2

```

Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu
 1             5             10             15
Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu
      20             25             30
Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro
      35             40             45
Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu
      50             55             60
Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile
 65             70             75             80
Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu
      85             90             95
Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala
      100            105            110
Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser
      115            120            125
Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu
      130            135            140
Thr Val Ser Pro Glu Phe Leu Ala Gly Gly Val Thr Thr Phe Val Ala
      145            150            155            160
Leu Tyr Asp Tyr Glu Ser Arg Thr Glu Thr Asp Leu Ser Phe Lys Lys
      165            170            175
Gly Glu Arg Leu Gln Ile Val Asn Asn Thr Glu Gly Asp Trp Trp Leu
      180            185            190
Ala His Ser Leu Ser Thr Gly Gln Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr
      195            200            205

```

Val Ala Pro Ser Gly Ile

210

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 345

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hybrid gene

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (16)..(339)

&lt;400&gt; 3

```

gctagcgccg ccacc atg ggc cct aaa aag aag cgt aaa gtc gcc ccc ccg   51
           Met Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Pro Pro
                1             5             10
acc gat gtc agc ctg ggg gac gag ctc cac tta gac ggc gag gac gtg   99
Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His Leu Asp Gly Glu Asp Val
        15             20             25
gcg atg gcg cat gcc gac gcg cta gac gat ttc gat ctg gac atg ttg  147
Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu
        30             35             40
ggg gac ggg gat tcc ccg ggg ccg gga ttt acc ccc cac gac tcc gcc  195
Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr Pro His Asp Ser Ala
        45             50             55             60
ccc tac ggc gct ctg gat atg gcc gac ttc gag ttt gag cag atg ttt  243
Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe
        65             70             75
acc gat gcc ctt gga att gac gag tac ggt ggg gaa ttc ccg ggg atc  291
Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly Glu Phe Pro Gly Ile
        80             85             90
cgt cga gtt tet tta gct cgt cgt cct tta cct cct tta cct cgt tat  339
Arg Arg Val Ser Leu Ala Arg Arg Pro Leu Pro Pro Leu Pro Arg Tyr
        95             100             105
aagctt

```

345

5/35

<210> 4  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> hybrid protein

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (8)..(87)  
 <223> VP16AD

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (95)..(108)  
 <223> Pro5

<400> 4  
 Met Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser  
   1                  5                  10                  15  
 Leu Gly Asp Glu Leu His Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His  
           20                  25                  30  
 Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp  
           35                  40                  45  
 Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala  
           50                  55                  60  
 Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu  
           65                  70                  75                  80  
 Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly Glu Phe Pro Gly Ile Arg Arg Val Ser  
                   85                  90                  95  
 Leu Ala Arg Arg Pro Leu Pro Pro Leu Pro Arg Tyr  
                   100                  105

<210> 5  
 <211> 504  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hybrid gene

<220>

<221> CDS

<222> (16)..(498)

<400> 5

```

getagcgccg ccacc atg ggc cct aaa aag aag cgt aaa gtc gcc ccc ccg      51
                Met Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Pro Pro
                  1             5             10

acc gat gtc agc ctg ggg gac gag ctc cac tta gac ggc gag gac gtg      99
Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His Leu Asp Gly Glu Asp Val
      15             20             25

gcg atg gcg cat gcc gac gcg cta gac gat ttc gat ctg gac atg ttg     147
Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu
      30             35             40

ggg gac ggg gat tcc cgg ggg cgg gga ttt acc ccc cac gac tcc gcc     195
Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr Pro His Asp Ser Ala
      45             50             55             60

ccc tac ggc gct ctg gat atg gcc gac ttc gag ttt gag cag atg ttt     243
Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe
      65             70             75

acc gat gcc ctt gga att gac gag tac ggt ggg gaa ttc acc atg gag     291
Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly Glu Phe Thr Met Glu
      80             85             90

gag cgg cag tca gat cct agc gtc gag ccc cct ctg agt cag gaa aca     339
Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr
      95             100            105

ttt tca gac cta tgg aaa cta ctt cct gaa aac aac gtt ctg tcc ccc     387
Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro
      110            115            120

ttg cgg tcc caa gca atg gat gat ttg atg ctg tcc cgg gac gat att     435
Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile
      125            130            135            140

gaa caa tgg ttc act gaa gac gtt tct tta gct cgt cgt cct tta cct     483

```

7/35

Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Val Ser Leu Ala Arg Arg Pro Leu Pro  
 145 150 155  
 cct tta cct cgt tat ggatcc 504  
 Pro Leu Pro Arg Tyr  
 160

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 161

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hybrid protein

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMAIN

&lt;222&gt; (8)..(87)

&lt;223&gt; VP16AD

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMAIN

&lt;222&gt; (90)..(147)

&lt;223&gt; p53AD

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMAIN

&lt;222&gt; (148)..(161)

&lt;223&gt; Pro5

&lt;400&gt; 6

Met Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Asp Glu Leu His Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His  
 20 25 30  
 Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala  
 50 55 60



8/35

[illegible]

<210> 7

&lt;211&gt; 1446

&lt;212&gt; DNA

### <213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$ 

<223> hybrid gene

 $\langle 220 \rangle$ 

&lt;221&gt; CDS

 $\langle 222 \rangle$  (1) .. (1440)

<400> 7

atg	aag	cta	ctg	tct	tct	atc	gaa	caa	gca	tgc	gat	att	tgc	cga	ctt	48
Met	Lys	Leu	Leu	Ser	Ser	Ile	Glu	Gln	Ala	Cys	Asp	Ile	Cys	Arg	Leu	
1				5					10					15		
aaa	aag	ctc	aag	tgc	tcc	aaa	gaa	aaa	cgg	aag	tgc	gcc	aag	tgt	ctg	96
Lys	Lys	Leu	Lys	Cys	Ser	Lys	Glu	Lys	Pro	Lys	Cys	Ala	Lys	Cys	Leu	
				20					25					30		
aag	aac	aac	tgg	gag	tgt	cgc	tac	tct	ccc	aaa	acc	aaa	agg	tct	ccg	144
Lys	Asn	Asn	Trp	Glu	Cys	Arg	Tyr	Ser	Pro	Lys	Thr	Lys	Arg	Ser	Pro	
				35				40						45		
ctg	act	agg	gca	cat	ctg	aca	gaa	gtg	gaa	tca	agg	cta	gaa	aga	ctg	192
Leu	Thr	Arg	Ala	His	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Ser	Arg	Leu	Glu	Arg	Leu	

50	55	60	
gaa cag cta ttt cta ctg att ttt cct cga gaa gac ctt gac atg att	240		
Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile			
65	70	75	80
ttg aaa atg gat tct tta cag gat ata aaa gca ttg tta aca gga tta	288		
Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu			
85	90	95	
ttt gta caa gat aat gtg aat aaa gat gcc gtc aca gat aga ttg gct	336		
Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala			
100	105	110	
tca gtg gag act gat atg cct cta aca ttg aga cag cat aga ata agt	384		
Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser			
115	120	125	
gcg aca tca tca tcg gaa gag agt agt aac aaa ggt caa aga cag ttg	432		
Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu			
130	135	140	
act gta tcg ccg gaa ttg tct gct gga gac atg aga gct gcc aac ctt	480		
Thr Val Ser Pro Glu Leu Ser Ala Gly Asp Met Arg Ala Ala Asn Leu			
145	150	155	160
tgg cca agc ccg ctc atg atc aaa cgc tct aag aag aac agc ctg gcc	528		
Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys Asn Ser Leu Ala			
165	170	175	
ttg tcc ctg acg gcc gac cag atg gtc agt gcc ttg ttg gat gct gag	576		
Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu Asp Ala Glu			
180	185	190	
ccc ccc ata ctc tat tcc gag tat gat cct acc aga ccc ttc agt gaa	624		
Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro Phe Ser Glu			
195	200	205	
gct tcg atg atg ggc tta ctg acc aac ctg gca gac agg gag ctg gtt	672		
Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg Glu Leu Val			
210	215	220	
cac atg atc aac tgg cgc aag agg gtg cca ggc ttt gtg gat ttg acc	720		
His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val Asp Leu Thr			
225	230	235	240
ctc cat gat cag gtc cac ctt cta gaa tgt gcc tgg cta gag atc ctg	768		
Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu Glu Ile Leu			
245	250	255	
atg att ggt ctc gtc tgg cgc tcc atg gag cac cca ggg aag cta ctg	816		

10/35

Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro Gly Lys Leu Leu	
260	265
270	
ttt gct cct aac ttg ctc ttg gac agg aac cag gga aaa tgt gta gag	864
Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly Lys Cys Val Glu	
275	280
285	
ggc atg gtg gag atc ttc gac atg ctg ctg gct aca tca tct cgg ttc	912
Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser Ser Arg Phe	
290	295
300	
cgc atg atg aat ctg cag gga gag gag ttt gtg tgc ctc aaa tct att	960
Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu Lys Ser Ile	
305	310
315	320
att ttg ctt aat tct gga gtg tac aca tit ctg tcc agc acc ctg aag	1008
Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser Thr Leu Lys	
325	330
335	
tct ctg gaa gag aag gac cat atc cac cga gtc ctg gac aag atc aca	1056
Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp Lys Ile Thr	
340	345
350	
gac act ttg atc cac ctg atg gcc aag gca ggc ctg acc ctg cag cag	1104
Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu Thr Leu Gln Gln	
355	360
365	
cag cac cag cgg ctg gcc cag ctc ctc ctc atc ctc tcc cac atc agg	1152
Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu Ser His Ile Arg	
370	375
380	
cac atg agt aac aaa ggc atg gag cat ctg tac agc atg aag tgc aag	1200
His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys	
385	390
395	400
aac gtg gtg ccc ctc tat gac ctg ctg ctg gag atg ctg gac gcc cac	1248
Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu Asp Ala His	
405	410
415	
cgc cta cat gcg ccc act agc cgt gga ggg gca tcc gtg gag gag acg	1296
Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val Glu Glu Thr	
420	425
430	
gac caa agc cac ttg gcc act gcg ggc tct act tca tgc cat tcc ttg	1344
Asp Gln Ser His Leu Ala Thr Ala Gly Ser Thr Ser Ser His Ser Leu	
435	440
445	
caa aag tat tac atc acg ggg gag gca gag ggt ttc cct gcc aca gtc	1392
Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe Pro Ala Thr Val	
450	455
460	

11/35

```

gaa ttc gtt tct tta gct cgt cgt cct tta cct cct tta cct cgt tat 1440
Glu Phe Val Ser Leu Ala Arg Arg Pro Leu Pro Pro Leu Pro Arg Tyr
465                470                475                480
ggatcc                                                    1446

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 480

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hybrid protein

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DNA\_BIND

&lt;222&gt; (1)..(147)

&lt;223&gt; GAL4DBD

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMAIN

&lt;222&gt; (151)..(464)

&lt;223&gt; ERLBD

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMAIN

&lt;222&gt; (467)..(480)

&lt;223&gt; Pro5

&lt;400&gt; 8

```

Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu
  1                5                10                15
Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu
      20                25                30
Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro
      35                40                45
Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu
      50                55                60
Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile

```

12/35

65		70		75		80
Leu Lys Met Asp Ser	Leu Gln Asp Ile	Lys Ala Leu Leu Thr	Gly Leu			
	85		90		95	
Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala						
	100		105		110	
Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser						
	115		120		125	
Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu						
	130		135		140	
Thr Val Ser Pro Glu Leu Ser Ala Gly Asp Met Arg Ala Ala Asn Leu						
	145		150		155	
Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys Asn Ser Leu Ala						
	165		170		175	
Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu Asp Ala Glu						
	180		185		190	
Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro Phe Ser Glu						
	195		200		205	
Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg Glu Leu Val						
	210		215		220	
His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val Asp Leu Thr						
	225		230		235	
Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu Glu Ile Leu						
	245		250		255	
Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro Gly Lys Leu Leu						
	260		265		270	
Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly Lys Cys Val Glu						
	275		280		285	
Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser Ser Arg Phe						
	290		295		300	
Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu Lys Ser Ile						
	305		310		315	
Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser Thr Leu Lys						
	325		330		335	
Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp Lys Ile Thr						
	340		345		350	
Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu Thr Leu Gln Gln						
	355		360		365	
Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu Ser His Ile Arg						

13/35

370	375	380	
His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys			
385	390	395	400
Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu Asp Ala His			
	405	410	415
Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val Glu Glu Thr			
	420	425	430
Asp Gln Ser Ser His Leu Ala Thr Ala Gly Ser Thr Ser Ser His Ser Leu			
	435	440	445
Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe Pro Ala Thr Val			
	450	455	460
Glu Phe Val Ser Leu Ala Arg Arg Pro Leu Pro Pro Leu Pro Arg Tyr			
465	470	475	480

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 654

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hybrid gene

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (16)..(648)

&lt;400&gt; 9

```

gctagcgccg ccacc atg ggc cct aaa aag aag cgt aaa gtc gcc ccc ccg   51
      Met Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Pro Pro
              1              5              10
acc gat gtc agc ctg ggg gac gag ctc cac tta gac ggc gag gac gtg   99
Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His Leu Asp Gly Glu Asp Val
      15              20              25
gcg atg gcg cat gcc gac gcg cta gac gat ttc gat ctg gac atg ttg   147
Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu
      30              35              40
ggg gac ggg gat tcc ccg ggg ccg gga ttt acc ccc cac gac tcc gcc   195
Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr Pro His Asp Ser Ala

```

14/35

45	50	55	60	
ccc tac ggc gct ctg gat atg gcc gac ttc gag ttt gag cag atg ttt	243			
Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe				
65	70	75		
acc gat gcc ctt gga att gac gag tac ggt ggg gaa ttg acc atg gag	291			
Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly Glu Leu Thr Met Glu				
80	85	90		
gag ccg cag tca gat cct agc gtc gag ccc cct ctg agt cag gaa aca	339			
Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr				
95	100	105		
ttt tca gac cta tgg aaa cta ctt cct gaa aac aac gtt ctg tcc ccc	387			
Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro				
110	115	120		
ttg ccg tcc caa gca atg gat gat ttg atg ctg tcc ccg gac gat att	435			
Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile				
125	130	135	140	
gaa caa tgg ttc act gaa gac gaa ttc ctg gcc ggt gga gtg acc acc	483			
Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Glu Phe Leu Ala Gly Gly Val Thr Thr				
145	150	155		
ttt gtg gcc ctc tat gac tat gag tct agg acg gag aca gac ctg tcc	531			
Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ser Arg Thr Glu Thr Asp Leu Ser				
160	165	170		
ttc aag aaa ggc gag cgg ctc cag att gtc aac aac aca gag gga gac	579			
Phe Lys Lys Gly Glu Arg Leu Gln Ile Val Asn Asn Thr Glu Gly Asp				
175	180	185		
tgg tgg ctg gcc cac tgc ctc agc aca gga cag aca ggc tac atc ccc	627			
Trp Trp Leu Ala His Ser Leu Ser Thr Gly Gln Thr Gly Tyr Ile Pro				
190	195	200		
agc aac tac gtg gcg ccc tcc ggatec	654			
Ser Asn Tyr Val Ala Pro Ser				
205	210			

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 211

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> hybrid protein

<220>

<221> DOMAIN

<222> (8)..(87)

<223> VP16AD

<220>

<221> DOMAIN

<222> (90)..(147)

<223> p53AD

<220>

<221> DOMAIN

<222> (151)..(211)

<223> src-SH3

<400> 10

Met Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser

1 5 10 15

Leu Gly Asp Glu Leu His Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His

20 25 30

Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp

35 40 45

Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala

50 55 60

Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu

65 70 75 80

Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly Glu Leu Thr Met Glu Glu Pro Gln Ser

85 90 95

Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu

100 105 110

Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro Ser Gln

115 120 125

Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe

130 135 140

Thr Glu Asp Glu Phe Leu Ala Gly Gly Val Thr Thr Phe Val Ala Leu

145 150 155 160



16/35

Tyr	Asp	Tyr	Glu	Ser	Arg	Thr	Glu	Thr	Asp	Leu	Ser	Phe	Lys	Lys	Gly
				165					170					175	
Glu	Arg	Leu	Gln	Ile	Val	Asn	Asn	Thr	Glu	Gly	Asp	Trp	Trp	Leu	Ala
			180					185					190		
His	Ser	Leu	Ser	Thr	Gly	Gln	Thr	Gly	Tyr	Ile	Pro	Ser	Asn	Tyr	Val
		195					200					205			
Ala	Pro	Ser													
		210													

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 291

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; a sequence to which DNA-binding domain binds

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; enhancer

&lt;222&gt; (1)..(129)

&lt;223&gt; UAS

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt; (130)..(291)

&lt;400&gt; 11

```

ggtaaccttc cgggacccgc tcggaggaca gtaactccgct cggaggacag tactccgctc 60
ggaggacagt actccgctcg aggacagtac tccgctcgga ggacagtact ccgacccgctc 120
gactctagac cccgccccagc gtcttgcata tggcgaaattc gaacacgcag atgcagtcgg 180
ggcggcgccg tcaccaggtcc acttcgcata ttaaggtagc gcgtgtggcc tcgaacaccg 240
agcgaccctg cagcgaccgc cttaacacgc tcaacacgct gccgcaagct t

```

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 927

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hybrid gene

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(918)

&lt;400&gt; 12

atg aag cta ctg tct tct atc gaa caa gca tgc gat att tgc cga ctt	48
Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu	
1 5 10 15	
aaa aag ctc aag tgc tcc aaa gaa aaa ccg aag tgc gcc aag tgt ctg	96
Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu	
20 25 30	
aag aac aac tgg gag tgt cgc tac tct ccc aaa acc aaa agg tct ccg	144
Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro	
35 40 45	
ctg act agg gca cat ctg aca gaa gtg gaa tca agg cta gaa aga ctg	192
Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu	
50 55 60	
gaa cag cta ttt cta ctg att ttt cct cga gaa gac ctt gac atg att	240
Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile	
65 70 75 80	
ttg aaa atg gat tct tta cag gat ata aaa gca ttg tta aca gga tta	288
Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu	
85 90 95	
ttt gta caa gat aat gtg aat aaa gat gcc gtc aca gat aga ttg gct	336
Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala	
100 105 110	
tca gtg gag act gat atg cct cta aca ttg aga cag cat aga ata agt	384
Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser	
115 120 125	
gcg aca tca tca tcg gaa gag agt agt aac aaa ggt caa aga cag ttg	432
Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu	
130 135 140	
act gta tcg ccg gaa ttc aga agg aaa cca gtg tca gaa aaa ata atg	480
Thr Val Ser Pro Glu Phe Arg Arg Lys Pro Val Ser Glu Lys Ile Met	
145 150 155 160	

18/35

gaa ata aag ctc att aaa ggt cct aaa ggt ctt ggg ttt agc att get	528
Glu Ile Lys Leu Ile Lys Gly Pro Lys Gly Leu Gly Phe Ser Ile Ala	
165 170 175	
gga ggt gtt gga aat cag cat att cct ggg gat aat agc atc tat gta	576
Gly Gly Val Gly Asn Gln His Ile Pro Gly Asp Asn Ser Ile Tyr Val	
180 185 190	
acc aaa ata att gaa gga ggt gca gca cat aag gat ggc aaa ctt cag	624
Thr Lys Ile Ile Glu Gly Gly Ala Ala His Lys Asp Gly Lys Leu Gln	
195 200 205	
att gga gat aaa ctt tta gca gtg aat aac gta tgt tta gaa gaa gtt	672
Ile Gly Asp Lys Leu Leu Ala Val Asn Asn Val Cys Leu Glu Glu Val	
210 215 220	
act cat gaa gaa gca gta act gcc tta aag aac aca tct gat ttt gtt	720
Thr His Glu Glu Ala Val Thr Ala Leu Lys Asn Thr Ser Asp Phe Val	
225 230 235 240	
tat ttg aaa gtg gca aaa ccc aca agt atg tat atg aat gat ggc tat	768
Tyr Leu Lys Val Ala Lys Pro Thr Ser Met Tyr Met Asn Asp Gly Tyr	
245 250 255	
gca cca cct gat atc acc aac tct tct tct cag cct gtt gat aac cat	816
Ala Pro Pro Asp Ile Thr Asn Ser Ser Ser Gln Pro Val Asp Asn His	
260 265 270	
gtt agc cca tct tcc ttc ttg ggc cag aca cca gca tct cca gcc aga	864
Val Ser Pro Ser Ser Phe Leu Gly Gln Thr Pro Ala Ser Pro Ala Arg	
275 280 285	
tac tcc cca gtt tct aaa gca gta ctt gga gat gat gaa att aca agg	912
Tyr Ser Pro Val Ser Lys Ala Val Leu Gly Asp Asp Glu Ile Thr Arg	
290 295 300	
gaa cct tga ggatcc	927
Glu Pro	
305	

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 306

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hybrid protein

19/35

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DNA\_BIND

&lt;222&gt; (1)..(147)

&lt;223&gt; GAL4DBD

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMAIN

&lt;222&gt; (161)..(247)

&lt;223&gt; hD1g-PDZ2

&lt;400&gt; 13

```

Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu
  1             5             10             15
Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu
             20             25             30
Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro
             35             40             45
Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu
             50             55             60
Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile
             65             70             75             80
Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu
             85             90             95
Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala
             100            105            110
Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser
             115            120            125
Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu
             130            135            140
Thr Val Ser Pro Glu Phe Arg Arg Lys Pro Val Ser Glu Lys Ile Met
             145            150            155            160
Glu Ile Lys Leu Ile Lys Gly Pro Lys Gly Leu Gly Phe Ser Ile Ala
             165            170            175
Gly Gly Val Gly Asn Gln His Ile Pro Gly Asp Asn Ser Ile Tyr Val
             180            185            190
Thr Lys Ile Ile Glu Gly Gly Ala Ala His Lys Asp Gly Lys Leu Gln
             195            200            205

```

20/35

```

Ile Gly Asp Lys Leu Leu Ala Val Asn Asn Val Cys Leu Glu Glu Val
  210                      215                      220
Thr His Glu Glu Ala Val Thr Ala Leu Lys Asn Thr Ser Asp Phe Val
225                      230                      235                      240
Tyr Leu Lys Val Ala Lys Pro Thr Ser Met Tyr Met Asn Asp Gly Tyr
                      245                      250                      255
Ala Pro Pro Asp Ile Thr Asn Ser Ser Ser Gln Pro Val Asp Asn His
                      260                      265                      270
Val Ser Pro Ser Ser Phe Leu Gly Gln Thr Pro Ala Ser Pro Ala Arg
                      275                      280                      285
Tyr Ser Pro Val Ser Lys Ala Val Leu Gly Asp Asp Glu Ile Thr Arg
                      290                      295                      300
Glu Pro
305

```

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 1251

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hybrid gene

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1242)

&lt;400&gt; 14

```

atg aag cta ctg tct tct atc gaa caa gca tgc gat att tgc cga ctt      48
Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu
  1          5          10          15
aaa aag ctc aag tgc tcc aaa gaa aaa ccg aag tgc gcc aag tgt ctg      96
Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu
                      20          25          30
aag aac aac tgg gag tgt cgc tac tct ccc aaa acc aaa agg tct ccg      144
Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro
                      35          40          45
ctg act agg gca cat ctg aca gaa gtg gaa tca agg cta gaa aga ctg      192

```

21/35

Leu Thr Arg Ala His	Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg	Leu Glu Arg Leu	
50	55	60	
gaa cag cta ttt cta ctg att ttt cct cga gaa gac ctt gac atg att			240
Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile			
65	70	75	80
ttg aaa atg gat tct tta cag gat ata aaa gca ttg tta aca gga tta			288
Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu			
85	90	95	
ttt gta caa gat aat gtg aat aaa gat gcc gtc aca gat aga ttg gct			336
Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala			
100	105	110	
tca gtg gag act gat atg cct cta aca ttg aga cag cat aga ata agt			384
Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser			
115	120	125	
gcg aca tca tca tcg gaa gag agt agt aac aaa ggt caa aga cag ttg			432
Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu			
130	135	140	
act gta tcg ccg gaa ttc ctg gtc aac aca gat agc ttg gaa aca cca			480
Thr Val Ser Pro Glu Phe Leu Val Asn Thr Asp Ser Leu Glu Thr Pro			
145	150	155	160
act tac gtt aat gcc aca gat gca gat tat gaa tat gaa gaa atc aca			528
Thr Tyr Val Asn Gly Thr Asp Ala Asp Tyr Glu Tyr Glu Glu Ile Thr			
165	170	175	
ctt gaa agg gga aat tca ggg ctt ggt ttc agc att gca gga ggt acg			576
Leu Glu Arg Gly Asn Ser Gly Leu Gly Phe Ser Ile Ala Gly Gly Thr			
180	185	190	
gac aac cca cac att gga gat gac tca agt att ttc att acc aaa att			624
Asp Asn Pro His Ile Gly Asp Asp Ser Ser Ile Phe Ile Thr Lys Ile			
195	200	205	
atc aca ggg gga gca gcc gcc caa gat gga aga ttg cgg gtc aat gac			672
Ile Thr Gly Gly Ala Ala Ala Gln Asp Gly Arg Leu Arg Val Asn Asp			
210	215	220	
tgt ata tta cga gta aat gaa gta gat gtt cgt gat gta aca cat agc			720
Cys Ile Leu Arg Val Asn Glu Val Asp Val Arg Asp Val Thr His Ser			
225	230	235	240
aaa gca gtt gaa gcg ttg aaa gaa gca ggg tct att gta cgc ttg tat			768
Lys Ala Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Gly Ser Ile Val Arg Leu Tyr			
245	250	255	

22/35

```

gta aaa aga agg aaa cca gtg tca gaa aaa ata atg gaa ata aag ctc      816
Val Lys Arg Arg Lys Pro Val Ser Glu Lys Ile Met Glu Ile Lys Leu
      260                      265                      270

att aaa ggt cct aaa ggt ctt ggg ttt agc att gct gga ggt gtt gga      864
Ile Lys Gly Pro Lys Gly Leu Gly Phe Ser Ile Ala Gly Gly Val Gly
      275                      280                      285

aat cag cat att cct ggg gat aat agc atc tat gta acc aaa ata att      912
Asn Gln His Ile Pro Gly Asp Asn Ser Ile Tyr Val Thr Lys Ile Ile
      290                      295                      300

gaa gga ggt gca gca cat aag gat ggc aaa ctt cag att gga gat aaa      960
Glu Gly Gly Ala Ala His Lys Asp Gly Lys Leu Gln Ile Gly Asp Lys
      305                      310                      315                      320

ctt tta gca gtg aat aac gta tgt tta gaa gaa gtt act cat gaa gaa      1008
Leu Leu Ala Val Asn Asn Val Cys Leu Glu Glu Val Thr His Glu Glu
      325                      330                      335

gca gta act gcc tta aag aac aca tct gat ttt gtt tat ttg aaa gtg      1056
Ala Val Thr Ala Leu Lys Asn Thr Ser Asp Phe Val Tyr Leu Lys Val
      340                      345                      350

gca aaa ccc aca agt atg tat atg aat gat ggc tat gca cca cct gat      1104
Ala Lys Pro Thr Ser Met Tyr Met Asn Asp Gly Tyr Ala Pro Pro Asp
      355                      360                      365

atc acc aac tct tct tct cag cct gtt gat aac cat gtt agc cca tct      1152
Ile Thr Asn Ser Ser Ser Gln Pro Val Asp Asn His Val Ser Pro Ser
      370                      375                      380

tcc ttc ttg ggc cag aca cca gca tct cca gcc aga tac tcc cca gtt      1200
Ser Phe Leu Gly Gln Thr Pro Ala Ser Pro Ala Arg Tyr Ser Pro Val
      385                      390                      395                      400

tct aaa gca gta ctt gga gat gat gaa att aca agg gaa cct tgaaggatcc 1251
Ser Lys Ala Val Leu Gly Asp Asp Glu Ile Thr Arg Glu Pro
      405                      410

```

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 414

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hybrid protein

23/35

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DNA\_BIND

&lt;222&gt; (1)..(147)

&lt;223&gt; GAL4DBD

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMAIN

&lt;222&gt; (174)..(260)

&lt;223&gt; hD1g-PDZ1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMAIN

&lt;222&gt; (269)..(355)

&lt;223&gt; hD1g-PDZ2

&lt;400&gt; 15

Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu

1 5 10 15

Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu

20 25 30

Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro

35 40 45

Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu

50 55 60

Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile

65 70 75 80

Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu

85 90 95

Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala

100 105 110

Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser

115 120 125

Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu

130 135 140

Thr Val Ser Pro Glu Phe Leu Val Asn Thr Asp Ser Leu Glu Thr Pro

145 150 155 160

Thr Tyr Val Asn Gly Thr Asp Ala Asp Tyr Glu Tyr Glu Glu Ile Thr



24/35

	165		170		175
Leu	Glu	Arg	Gly	Asn	Ser
			Gly	Leu	Gly
			Phe	Ser	Ile
			Ala	Gly	Gly
			Thr		
	180		185		190
Asp	Asn	Pro	His	Ile	Gly
			Asp	Asp	Ser
			Ser	Ser	Ile
			Phe	Ile	Thr
			Lys	Ile	
	195		200		205
Ile	Thr	Gly	Gly	Ala	Ala
			Ala	Gln	Asp
			Gly	Arg	Leu
			Val	Asn	Asp
	210		215		220
Cys	Ile	Leu	Arg	Val	Asn
			Glu	Val	Asp
			Val	Arg	Asp
			Val	Thr	His
			Ser		
	225		230		235
Lys	Ala	Val	Glu	Ala	Gly
			Ser	Ile	Val
			Arg	Leu	Tyr
	245		250		255
Val	Lys	Arg	Arg	Lys	Pro
			Val	Ser	Glu
			Lys	Ile	Met
			Glu	Ile	Lys
			Leu		
	260		265		270
Ile	Lys	Gly	Pro	Lys	Gly
			Leu	Gly	Phe
			Ser	Ile	Ala
			Gly	Gly	Val
			Gly		
	275		280		285
Asn	Gln	His	Ile	Pro	Gly
			Asp	Asn	Ser
			Ile	Tyr	Val
			Thr	Lys	Ile
			Ile		
	290		295		300
Glu	Gly	Gly	Ala	Ala	His
			Lys	Asp	Gly
			Lys	Leu	Gln
			Ile	Gly	Asp
			Lys		
	305		310		315
Leu	Leu	Ala	Val	Asn	Asn
			Val	Cys	Leu
			Glu	Glu	Val
			Thr	His	Glu
			Glu		
	325		330		335
Ala	Val	Thr	Ala	Leu	Lys
			Asn	Thr	Ser
			Asp	Phe	Val
			Tyr	Leu	Lys
			Val		
	340		345		350
Ala	Lys	Pro	Thr	Ser	Met
			Tyr	Met	Asn
			Asp	Gly	Tyr
			Ala	Pro	Pro
			Asp		
	355		360		365
Ile	Thr	Asn	Ser	Ser	Ser
			Gln	Pro	Val
			Asp	Asn	His
			Val	Ser	Pro
			Ser		
	370		375		380
Ser	Phe	Leu	Gly	Gln	Thr
			Pro	Ala	Ser
			Pro	Ala	Arg
			Tyr	Ser	Pro
			Val		
	385		390		395
Ser	Lys	Ala	Val	Leu	Gly
			Asp	Glu	Ile
			Thr	Arg	Glu
			Pro		
	405		410		

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 336

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

25/35

&lt;223&gt; hybrid gene

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (16)..(327)

&lt;400&gt; 16

```

gctagegcgcg ccacc atg ggc cct aaa aag aag cgt aaa gtc gcc ccc ccg      51
                Met Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Pro Pro
                1          5          10
acc gat gtc agc ctg ggg gac gag ctc cac tta gac ggc gag gac gtg      99
Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His Leu Asp Gly Glu Asp Val
                15          20          25
gcg atg gcg cat gcc gac gcg cta gac gat ttc gat ctg gac atg ttg     147
Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu
                30          35          40
ggg gac ggg gat tcc ccg ggg ccg gga ttt acc ccc cac gac tcc gcc     195
Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr Pro His Asp Ser Ala
                45          50          55          60
ccc tac ggc gct ctg gat atg gcc gac ttc gag ttt gag cag atg ttt     243
Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe
                65          70          75
acc gat gcc ctt gga att gac gag tac ggt ggg gaa ttc gat aaa aac     291
Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly Glu Phe Asp Lys Asn
                80          85          90
aac tgt tct aat gca aag gct gtg gag act gat gtg tga ggatcc      336
Asn Cys Ser Asn Ala Lys Ala Val Glu Thr Asp Val
                95          100

```

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 104

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hybrid protein

&lt;220&gt;

26/35

<221> DOMAIN  
 <222> (8)..(87)  
 <223> VP16AD

<220>  
 <221>DOMAIN  
 <222> (89)..(104)  
 <223> Kv1.4

<400> 17  
 Met Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser  
           1                  5                  10                  15  
 Leu Gly Asp Glu Leu His Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His  
                   20                  25                  30  
 Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp  
                   35                  40                  45  
 Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala  
           50                  55                  60  
 Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu  
           65                  70                  75                  80  
 Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly Glu Phe Asp Lys Asn Asn Cys Ser Asn  
                   85                  90                  95  
 Ala Lys Ala Val Glu Thr Asp Val  
                   100

<210> 18  
 <211> 516  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> hybrid gene

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (16)..(507)

<400> 18

27/35

```

gctagegcgc ccacc atg ggc cct aaa aag aag cgt aaa gtc gcc ccc cgc      51
      Met Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Pro Pro
      1              5              10
acc gat gtc agc ctg ggg gac gag ctc cac tta gac ggc gag gac gtg      99
Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His Leu Asp Gly Glu Asp Val
      15              20              25
gcg atg gcg cat gcc gac gcg cta gac gat ttc gat ctg gac atg ttg      147
Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu
      30              35              40
ggg gac ggg gat tcc ccg ggg ccg gga ttt acc ccc cac gac tcc gcc      195
Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr Pro His Asp Ser Ala
      45              50              55              60
ccc tac ggc gct ctg gat atg gcc gac ttc gag ttt gag cag atg ttt      243
Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe
      65              70              75
acc gat gcc ctt gga att gac gag tac ggt ggg gaa itg acc atg gag      291
Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly Glu Leu Thr Met Glu
      80              85              90
gag ccg cag tca gat cct agc gtc gag ccc cct ctg agt cag gaa aca      339
Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr
      95              100              105
ttt tca gac cta tgg aaa cta ctt cct gaa aac aac gtt ctg tcc ccc      387
Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro
      110              115              120
itg ccg tcc caa gca atg gat gat ttt atg ctg tcc ccg gac gat att      435
Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile
      125              130              135              140
gaa caa tgg ttc act gaa gac gaa ttc gat aaa aac aac tgt tct aat      483
Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Glu Phe Asp Lys Asn Asn Cys Ser Asn
      145              150              155
gca aag gct gtg gag act gat gtg tga ggaacc      516
Ala Lys Ala Val Glu Thr Asp Val
      160

```

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 164

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

$\langle 220 \rangle$ 

### <223> hybrid protein

 $\langle 220 \rangle$ 

&lt;221&gt; DOMAIN

<222> (8)..(87)

<223> VP16AD

 $\langle 220 \rangle$ 

## <221> DOMAIN

<222> (89)..(147)

<223> p53AD

 $\langle 220 \rangle$ 

&lt;221&gt; DOMAIN

<222> (150)..(164)

&lt;223&gt; Kv1.4

<400> 19

Met	Gly	Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	Ala	Pro	Pro	Thr	Asp	Val	Ser
1				5					10					15	
Leu	Gly	Asp	Glu	Leu	His	Leu	Asp	Gly	Glu	Asp	Val	Ala	Met	Ala	His
			20					25					30		
Ala	Asp	Ala	Leu	Asp	Asp	Phe	Asp	Leu	Asp	Met	Leu	Gly	Asp	Gly	Asp
		35				40					45				
Ser	Pro	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Pro	His	Asp	Ser	Ala	Pro	Tyr	Gly	Ala
	50					55					60				
Leu	Asp	Met	Ala	Asp	Phe	Glu	Phe	Glu	Gln	Met	Phe	Thr	Asp	Ala	Leu
65				70				75					80		
Gly	Ile	Asp	Glu	Tyr	Gly	Gly	Glu	Leu	Thr	Met	Glu	Glu	Pro	Gln	Ser
			85					90					95		
Asp	Pro	Ser	Val	Glu	Pro	Pro	Leu	Ser	Gln	Glu	Thr	Phe	Ser	Asp	Leu
			100				105					110			
Trp	Lys	Leu	Leu	Pro	Glu	Asn	Asn	Val	Leu	Ser	Pro	Leu	Pro	Ser	Gln
		115				120					125				
Ala	Met	Asp	Asp	Leu	Met	Leu	Ser	Pro	Asp	Asp	Ile	Glu	Gln	Trp	Phe
130						135					140				

29/35

Thr Glu Asp Glu Phe Asp Lys Asn Asn Cys Ser Asn Ala Lys Ala Val  
 145 150 155 160  
 Glu Thr Asp Val

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 699

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hybrid gene

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (16)..(690)

&lt;400&gt; 20

```

gctagcgccg ccacc atg ggc cct aaa aag aag cgt aaa gtc gcc ccc ccg      51
           Met Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Pro Pro
                1             5             10
acc gat gtc agc ctg ggg gac gag ctc cac tta gac ggc gag gac gtg      99
Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His Leu Asp Gly Glu Asp Val
           15             20             25
gcg atg gcg cat gcc gac gcg cta gac gat ttc gat ctg gac atg ttg      147
Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu
           30             35             40
ggg gac ggg gat tcc cgg ggg cgg gga ttt acc ccc cac gac tcc gcc      195
Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr Pro His Asp Ser Ala
           45             50             55             60
ccc tac ggc gct ctg gat atg gcc gac ttc gag ttt gag cag atg ttt      243
Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe
           65             70             75
acc gat gcc ctt gga att gac gag tac ggt ggg gaa ttg acc atg gag      291
Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly Glu Leu Thr Met Glu
           80             85             90
gag cgg cag tca gat cct agc gtc gag ccc cct ctg agt cag gaa aca      339
Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr
           95             100             105

```

30/35

```

ttt tca gac cta tgg aaa cta ctt cct gaa aac aac gtt ctg tcc ccc      387
Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro
      110                      115                      120
ttg ccg tcc caa gca atg gat gat ttg atg ctg tcc ccg gac gat att      435
Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile
      125                      130                      135                      140
gaa caa tgg ttc act gaa gac gaa ttg acc atg gag gag ccg cag tca      483
Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Glu Leu Thr Met Glu Glu Pro Gln Ser
      145                      150                      155
gat cct agc gtc gag ccc cct ctg agt cag gaa aca ttt tca gac cta      531
Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu
      160                      165                      170
tgg aaa cta ctt cct gaa aac aac gtt ctg tcc ccc ttg ccg tcc caa      579
Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro Ser Gln
      175                      180                      185
gca atg gat gat ttg atg ctg tcc ccg gac gat att gaa caa tgg ttc      627
Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe
      190                      195                      200
act gaa gac gaa ttc gaa ttc gtt tct gca gct cgt cgt cct tta cct      675
Thr Glu Asp Glu Phe Glu Phe Val Ser Ala Ala Arg Arg Pro Leu Pro
      205                      210                      215                      220
cct tta cct cgt tat taa ggatcc      699
Pro Leu Pro Arg Tyr
      225

```

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 225

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hybrid protein

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMAIN

&lt;222&gt; (8)..(87)

&lt;223&gt; VP16AD

31/35

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMAIN

&lt;222&gt; (89)..(147)

&lt;223&gt; p53AD

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMAIN

&lt;222&gt; (150)..(208)

&lt;223&gt; p53AD

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMAIN

&lt;222&gt; (213)..(225)

&lt;223&gt; Pro15

&lt;400&gt; 21

Met	Gly	Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	Ala	Pro	Pro	Thr	Asp	Val	Ser
1				5					10					15	
Leu	Gly	Asp	Glu	Leu	His	Leu	Asp	Gly	Glu	Asp	Val	Ala	Met	Ala	His
			20					25					30		
Ala	Asp	Ala	Leu	Asp	Asp	Phe	Asp	Leu	Asp	Met	Leu	Gly	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Ser	Pro	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Pro	His	Asp	Ser	Ala	Pro	Tyr	Gly	Ala
	50				55						60				
Leu	Asp	Met	Ala	Asp	Phe	Glu	Phe	Glu	Gln	Met	Phe	Thr	Asp	Ala	Leu
65				70					75					80	
Gly	Ile	Asp	Glu	Tyr	Gly	Gly	Glu	Leu	Thr	Met	Glu	Glu	Pro	Gln	Ser
			85					90						95	
Asp	Pro	Ser	Val	Glu	Pro	Pro	Leu	Ser	Gln	Glu	Thr	Phe	Ser	Asp	Leu
			100					105					110		
Trp	Lys	Leu	Leu	Pro	Glu	Asn	Asn	Val	Leu	Ser	Pro	Leu	Pro	Ser	Gln
	115					120						125			
Ala	Met	Asp	Asp	Leu	Met	Leu	Ser	Pro	Asp	Asp	Ile	Glu	Gln	Trp	Phe
	130				135						140				
Thr	Glu	Asp	Glu	Leu	Thr	Met	Glu	Glu	Pro	Gln	Ser	Asp	Pro	Ser	Val
145				150					155					160	
Glu	Pro	Pro	Leu	Ser	Gln	Glu	Thr	Phe	Ser	Asp	Leu	Trp	Lys	Leu	Leu
			165					170						175	



32/35

Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp  
                   180                  185                  190  
 Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Glu  
                   195                  200                  205  
 Phe Glu Phe Val Ser Ala Ala Arg Arg Pro Leu Pro Pro Leu Pro Arg  
                   210                  215                  220  
 Tyr  
 225

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for amplification of DNA encoding SH3

&lt;400&gt; 22

aaagaattcc tggccggtgg agtga

25

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for amplification of DNA encoding SH3

&lt;400&gt; 23

tttggatccc ggagggcgcc ac

22

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for amplification of DNA encoding p53AD

<400> 24  
 aaacaattga ccatggagga gc 22

<210> 25  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> primer for amplification of DNA encoding p53AD

<400> 25  
 aaagaattcg tcttcagtga accattgttc aa 32

<210> 26  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Pro5

<400> 26  
 Val Ser Leu Ala Arg Arg Pro Leu Pro Pro Leu Pro Arg Tyr  
 1 5 10

<210> 27  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> primer for amplification of DNA encoding ERLBD

<400> 27  
 aaacaattgt ctgctggaga catgagagc 29

34/35

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for amplification of DNA encoding ERLBD

&lt;400&gt; 28

aaagaattcg actgtggcag ggaacc

27

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for amplification of DNA encoding PDZ2

&lt;400&gt; 29

aaagaattca gaaggaaacc agtgcagaa a

31

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for amplification of DNA encoding PDZ2

&lt;400&gt; 30

aaaggatcct caaggttccc ttgtaatttc at

32

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>

<223> primer for amplification of DNA encoding PDZ1-PDZ2

<400> 31

aaagaattcc tggtaaacac agatagcttg 30

<210> 32

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for amplification of DNA encoding PDZ1-PDZ2

<400> 32

aaagatcct caaggtccc ttgtaatttc at 32

<210> 33

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding Kv1.4

<400> 33

aaagaattcg ataaaaacaa ctgttctaata gcaaaggctg tggagactga tgtgtgagga 60

tcctaaa 66

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03353

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.<sup>7</sup> C12Q 1/02, C12Q 1/42, C12Q 1/68, C07K 19/00, C12N 15/62, C12N 5/10, G01N 33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.<sup>7</sup> C12Q 1/02, C12Q 1/42, C12Q 1/68, C07K 19/00, C12N 15/62, C12N 5/10, G01N 33/566

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 99/10510, A2 (ARIAD GENE THERAPEUTICS INC), 04 March, 1999 (04.03.99) & AU, 9890361, A & US, 6015709, A & EP, 1017829, A1	1-17
P, X	NATESAN, S. et al., "A general strategy to enhance the potency of chimeric transcriptional activators", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999.Nov.) Vol.96, No.24, pp.13898-13903	1-17
Y	LWO, Y. et al., "Mammalian two-hybrid system: a complementary approach to the yeast two-hybrid system", Biotechniques (1997) Vol.22, No.2, pp.350-352	1-17
Y	FEARON, E. R. et al., "Karyoplasmic interaction selection strategy: a general strategy to detect protein-protein interaction in mammalian cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) Vol.89, No.17, pp.7958-7962	1-17
Y	CHIEN C. T. et al., "The two-hybrid system: a method of identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest",	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance"E" earlier document but published on or after the international filing  
date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed"I" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
10 August, 2000 (10.08.00)Date of mailing of the international search report  
22 August, 2000 (22.08.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03353

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p data-bbox="225 207 704 247">Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) Vol.88, No.21, pp.9578-9582</p>	

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12Q 1/02, C12Q 1/42, C12Q 1/68, C07K 19/00, C12N 15/62, C12N 5/10, G01N 33/566

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12Q 1/02, C12Q 1/42, C12Q 1/68, C07K 19/00, C12N 15/62, C12N 5/10, G01N 33/566

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST7474 (JOLIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 99/10510, A2 (ARIAD GENE THERAPEUTICS INC) 04. 3. 1999 (04. 03. 99) & AU, 9890361, A & US, 6015709, A & EP, 1017829, A1	1-17
P, X	NATESAN, S. et al. "A general strategy to enhance the potency of chimeric transcriptional activators", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999. Nov. ) Vol. 96, No. 24, p. 13898-13903	1-17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10. 08. 00

国際調査報告の発送日

22.08.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高畑 栄二

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B 9281

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	LUO, Y. et al. "Mammalian two-hybrid system: a complementary approach to the yeast two-hybrid system", Biotechniques (1997) Vol. 22, No. 2, p. 350-352	1-17
Y	FEARON, E. R. et al. "Karyoplasmic interaction selection strategy: a general strategy to detect protein-protein interaction in mammalian cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) Vol. 89, No. 17, p. 7958-7962	1-17
Y	CHIEN, C. T. et al. "The two-hybrid system: a method of identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) Vol. 88, No. 21, p. 9578-9582	1-17